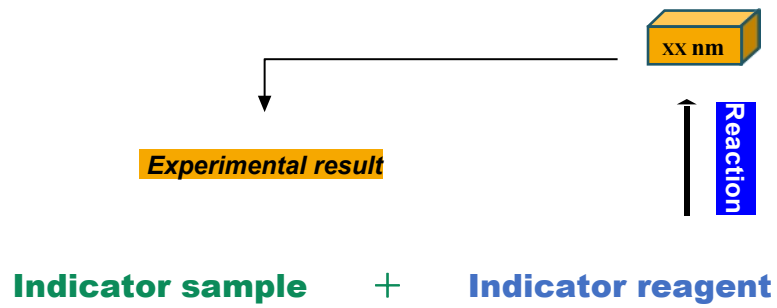


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## NADP 磷酸酶 (NADPase) 试剂盒说明书

### 微量法

正式测定前务必取 2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

NADPase主要存在于植物组织中，是生物体内唯一催化NADP<sup>+</sup>降解为NAD<sup>+</sup>的酶，与NADK一起调控NAD和NADP之间的平衡。

测定原理：

NADPase能够催化NADP<sup>+</sup>水解为NAD<sup>+</sup>和无机磷的反应，通过测定无机磷的量来测定NADPase 活性。

所需的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	100mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	液体15 mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×4 支	-20℃保存	用时加入1mL试剂一充分溶解备用，现配现用
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃保存	用时加入25mL蒸馏水，溶解后4℃可保存一周
试剂四	粉剂×1 瓶	4℃保存	用时加入25mL蒸馏水，溶解后4℃可保存一周
试剂五	液体25mL×1 瓶	室温保存	-
试剂六	10mmol/L标准磷贮备液10mL×1瓶	4℃保存	-

0.5 μmol/mL 标准磷应用液配制：将试剂六20倍稀释，即取0.5mL试剂六加9.5蒸馏水，充分混匀。

定磷试剂的配制：按H<sub>2</sub>O：试剂三：试剂四：试剂五=2：1：1：1 的比例配制，配好的定磷试剂应为浅黄色，若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，定磷剂现用现配

**注意：**配试剂最好用新的烧杯、玻棒和玻璃移液器，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。

样本的前处理：

按照组织质量 (g) : 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

操作步骤：

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 660nm, 蒸馏水调零。
- 2、酶促反应 (在 EP 管中加入下列试剂)

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	120	120
试剂二	40	40
37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 预热 5min		
样本	40	
蒸馏水		40

37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 准确反应 30min 后, 95℃ 水浴 5min (盖紧, 以防止水分散失), 冷却后, 10000g 25℃ 离心 5min, 取上清

- 3、定磷 (在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂)

	标准管	空白管	测定管	对照管
0.5 μmol/ml 标准磷应用液	20			
蒸馏水		20		
上清液			20	20
定磷试剂	200	200	200	200

混匀, 25℃ 室温放置 30min, 在 660nm 处, 记录各管吸光值。

注意事项：

- 1、此法具有微量、灵敏、快速的特点。所以对测定所用试管要求严格, 要没有一点磷, 若试管放过磷酸或磷酸盐缓冲液, 一定要洗得非常干净, 要先用洗洁精加水煮, 再用自来水冲, 最后用蒸馏水冲干净。最好用一次性塑料管或新玻璃管, 避免磷污染是检测成败的关键。
- 2、标准管、空白管和对照管只要做一次即可。

NADPase 酶活性计算：

- 1、按组织蛋白浓度计算：

定义：每小时每毫克组织蛋白 NADPase 分解 NADP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个 NADPase 活力单位。

$$\text{NADPase } (\mu\text{mol/h/mg prot}) = (C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}) \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div (V \text{ 样} \times C_{pr}) \div T = 5 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div C_{pr}$$

- 2、按样本鲜重计算：

定义：每小时每 g 组织 NADPase 分解 NADP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个 NADPase 活力单位。

$$\text{NADPase } (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = (C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}) \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 5 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$$

C 标准管：标准管浓度, 0.5 μmol/mL; V 总：酶促反应总体积, 0.2mL; V 样：加入样本体积, 0.04mL; V 样总：加入提取液体积, 1mL; T：反应时间, 0.5小时; Cpr：样本蛋白质浓度, mg/mL; W：样本鲜重, g。